ORSAY
Série A, N°
N° D'ordre :
305

N° d'enregistrement

au C.N.R.S.

A.O. 1948

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en tout

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES: Appliquées

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

d'ORSAY

par

Monsieur CHAVERON Henri

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences Appliquées

Paris

Sujet de la Thèse : Contribution à la connaissance des matières grasses extraites des différentes parties anatomiques de la fève de Theobroma cacao.

soutenue le 1967 devant la Commission d'Examen

MM. LEDERER Président

PAQUOT Examinateurs

DAVID

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES MATIERES GRASSES EXTRAITES DES DIFFÉRENTES PARTIES ANATOMIQUES DE LA FÈVE DE THEOBROMA CACAO

par Henri CHAVERON

Directeur du Laboratoire d'Analyses et de Recherches
de Chocolaterie et de Confiserie (Paris)

UNIV. LEIDEN BIBL.

INTRODUCTION

La fève de **Théobroma cacao** sert de matière première à l'industrie de la chocolaterie pour la fabrication de la pâte, de la poudre et du beurre de cacao.

Elle est constituée de trois parties :

1° Un tégument, appelé communément « **coque** », de nature spongieuse et de structure scléreuse. Il représente plus de 10 % en poids de la fève et contient en moyenne 3 % de matières grasses.

2° Une partie nommée souvent à tort « **germe** »[1] et correspondant à l'ensemble, gemmule, tigelle et radicule. Le « germe » représente sensiblement 1 % de la fève et contient environ 3 % de matières grasses.

3° Les **cotylédons** qui constituent pondéralement et industriellement la partie principale de la fève de cacao. Ils renferment en moyenne 55 % de matières grasses qui, seules, ont droit, d'après la législation française, à l'appellation « beurre de cacao »[2].

Industriellement, les coques et les germes sont séparés des cotylédons. Il est très difficile d'obtenir une séparation parfaite de telle sorte que les cotylédons sont toujours souillés par une petite quantité, techniquement inévitable, de coques et de germes et inversement une petite partie des cotylédons se retrouve dans les coques et les germes.

Les cotylédons ainsi obtenus donnent, après broyage, la pâte de cacao. Celle-ci pressée, ou plus rarement traitée par solvant, fournit le **beurre de cacao.**

La partie constituée de coques, germes et de petits fragments d'amandes appelée « pousses », résidus ou déchets, généralement très mal définie en ce qui concerne le pourcentage relatif des différents éléments anatomiques de la fève peut être extraite par solvant. Les matières grasses ainsi obtenues sont parfois ajoutées au beurre de cacao dans des proportions variables[3].

Quelquefois les matières grasses sont extraites directement de la fève entière sans séparation préalable des coques et des germes. Dans ce cas, elles n'ont évidemment pas droit, d'après la législation française, à l'appellation « beurre de cacao ». Leur composition est bien définie en ce qui concerne les proportions de matières grasses de coques, de germes et d'amandes puisque, d'une part, dans la fève les proportions de ces différentes parties anatomiques sont elles-mêmes définies et que, d'autre part, les pourcentages de matières grasses dans les coques, les germes et les amandes sont connus. Ainsi les matières grasses extraites des fèves de cacao entières ont la composition suivante :

Matières grasses d'amandes	99,34 %
Matières grasses de coques	0,60 %
Matières grasses de germes	0,06 %

Le beurre de cacao, tel que nous venons de le définir, a fait l'objet de nombreuses recherches pures ou appliquées.

Au cours de leurs travaux fondamentaux sur la structure glycéridique et le polymorphisme des graisses naturelles en général, les chercheurs ont très souvent choisi le beurre de cacao comme matériau d'études ; cette matière grasse étant bien définie et présentant une composition glycéridique relativement simple.

Suscités par l'importance économique du beurre de cacao, de nombreux travaux ont été effectués dans le domaine de la recherche appliquée. Ils sont de deux ordres.

D'une part, des travaux qui ont pour objet l'étude des problèmes de cristallisation et de transformations polymorphiques des glycérides au cours de la fabrication et de la conservation du chocolat. Ces travaux ont eu surtout des applications technologiques.

D'autre part, des travaux analytiques qui ont pour but l'établissement des critères de pureté du beurre de cacao devant permettre une définition chimique de plus en plus précise de cette matière grasse.

Le point de nos connaissances dans ces différents domaines de recherches peut être fait schématiquement de la façon suivante :

---

1 Le germe du point de vue botanique étant synonyme d'embryon est constitué de l'ensemble gemmule, tigelle, radicule et cotylédons.

2 Bien que l'appellation « beurre de cacao » ne soit pas correcte du point de vue scientifique, le beurre de cacao n'étant pas une émulsion, nous avons sacrifié à l'usage en utilisant ce terme tout au long de notre travail.

3 Ce mélange de matières grasses n'a plus alors le droit à l'appellation beurre de cacao.

1° **Travaux fondamentaux sur la constitution chimique du beurre de cacao.**

On doit ici envisager deux aspects principaux : la composition glycéridique et la composition de l'insaponifiable.

En ce qui concerne la **composition glycéridique** du beurre de cacao, nous disposons de nombreux résultats mais ceux-ci ont été obtenus par des auteurs différents à l'aide de méthodes extrêmement diverses et sur des échantillons non précisément définis. De plus, l'étude de la dispersion de la composition glycéridique du beurre de cacao n'a pratiquement pas été entreprise. Les techniques chromatographiques couplées (chromatographie sur couche mince et en phase gazeuse) rapides et précises se prêtent bien aux analyses de série. Mais dans le cas du beurre de cacao, elles n'ont pratiquement pas été utilisées sur les glycérides non transformés chimiquement. Pour combler cette lacune, nous avons mis au point une méthode basée sur ces techniques et s'adaptant bien, de ce fait, aux analyses de série dans le but principalement d'entreprendre l'examen de la dispersion biologique des glycérides.

Contrairement aux glycérides, l'**insaponifiable** n'a fait l'objet que de rares travaux dont les plus récents et les plus exhaustifs remontent à 1940. Nous avons déterminé dans ce travail la composition des principales fractions de l'insaponifiable et étudié la dispersion biologique des différents composés identifiés et cela grâce à la mise au point d'une méthode d'analyses dérivée de nos travaux et applicable aux analyses de série.

2° **Recherches appliquées.**

Pour définir une matière grasse deux groupes de méthodes peuvent être envisagées. D'une part, les méthodes physiques portant sur l'ensemble de la matière grasse et donnant de celle-ci une vue « synthétique », et d'autre part, les méthodes permettant, par une analyse qualitative et quantitative de plus en plus fine des divers constituants, de définir l'ensemble.

En ce qui concerne les méthodes physiques les études antérieures faites sur les courbes de solidification ont été réexaminées ici et comparées à l'Analyse Thermique Différentielle (A.T.D.) que nous avons pour la première fois appliquée d'une façon systématique à l'étude du beurre de cacao.

Dans le domaine analytique les méthodes doivent être de plus en plus fines. Celles que nous avons mises au point pour la détermination de la composition du beurre de cacao et en particulier celles concernant la partie insaponifiable apportent des éléments nouveaux dans cette voie.

Les matières grasses de coques et de germes ont très peu intéressé les chercheurs. Ces graisses pouvant se trouver accidentellement ou intentionnellement dans le beurre de cacao il est important d'en connaître les caractéristiques. Nous avons, comme pour le beurre de cacao, déterminé la composition en acides gras et en insaponifiable de ces graisses ainsi que leur comportement en analyse thermique différentielle.

Schématiquement le travail est divisé en trois parties principales.

1re Partie : Etude physique.

2e Partie : Constitution chimique.
- A. Composition glycéridique.
- B. Composition de l'insaponifiable.

3e Partie : Application des techniques chromatographiques à la recherche des falsifications du beurre de cacao

Dans les parties I, II B et III, nous avons seulement reporté les conclusions de nos travaux qui ont été publiés in extenso par ailleurs. Seule la partie II A non encore publiée a fait l'objet d'un développement.

PREMIERE PARTIE

ETUDE PHYSIQUE AU MOYEN DE L'ANALYSE THERMIQUE

Cette étude a débuté par l'examen critique de la méthode de PICHARD puis elle a porté sur l'analyse thermique différentielle (A.T.D.).

L'importance des travaux que nous avons effectués dans ce domaine est justifiée par les possibilités que peuvent offrir ces méthodes, principalement l'A.T.D. dans l'examen des matières grasses.

I. - ETUDES DES PHENOMENES DE SOLIDIFICATION DU BEURRE DE CACAO CRITIQUE DE LA METHODE DE PICHARD

La méthode de PICHARD [1, 2 et 3] a été décrite dans plusieurs publications. Elle consiste à suivre les variations de température d'un échantillon de beurre de cacao, fondu à 40° C, au cours de son refroidissement dans une enceinte à 15° C. On peut alors tracer une courbe traduisant les variations de température en fonction du temps. La forme de cette courbe et la valeur de ses points caractéristiques permettent, d'après PICHARD, d'apprécier le degré de pureté d'un beurre de cacao. PICHARD considérait que cette méthode était nécessaire et suffisante pour résoudre tous les problèmes de falsification.

La courbe de solidification traduit une propriété physique et peut, à la rigueur, permettre de prévoir le comportement industriel du beurre de cacao lors de sa solidification. Elle rend compte aussi, dans une certaine mesure, de la composition glycéridique de la graisse étudiée, mais, comme tous les phénomènes de solidification, ou de transformation polymorphique qu'elle traduit, elle est influencée par des facteurs divers qui peuvent la modifier sensiblement sans pour cela que la constitution de la graisse soit en cause. Il est donc très important de savoir si les modifications observées dans la forme des courbes de solidification au cours de l'étude d'un beurre de cacao sont dues à des différences infinitésimales de composition ou si elles traduisent une profonde différence de constitution.

Nous avons effectué de très nombreux essais [4 et travaux non publiés) sur des beurres de cacao préparés au laboratoire dans des conditions différentes pour tenter de définir l'influence sur la forme des courbes de solidification de certains facteurs. Pendant tous les essais, les conditions expérimentales n'ont absolument pas été modifiées. Nous avons utilisé l'appareil de PICHARD tel qu'il a été conçu par l'auteur et nous avons travaillé dans les mêmes conditions que lui.

Toutes ces expériences montrent que la courbe de solidification est bien loin d'être nécessaire et suffisante, com-

me l'affirmait PICHARD, pour d'une part caractériser d'une façon non vague un beurre de cacao et, d'autre part, par voie de conséquence détecter facilement l'addition d'une matière grasse étrangère. PICHARD allait beaucoup plus loin encore puisqu'il prétendait pouvoir, à l'aide de sa méthode juger de la qualité des beurres de cacao purs.

De trop nombreux facteurs incontrôlables peuvent intervenir en modifiant notablement la courbe de solidification pour que l'on puisse accorder à celle-ci une valeur comme test de pureté. Nous avons pu montrer en effet que d'authentiques beurres de cacao comme le prouve leur origine ou comme l'a montré l'analyse complète, présentent des courbes anormales (en particulier les beurres extraits par solvants polaires) alors qu'au contraire des courbes typiques d'un bon beurre de cacao pouvaient être obtenues à partir de beurre contenant des matières grasses étrangères.

II. - ANALYSE THERMIQUE DIFFERENTIELLE

L'analyse thermique différentielle consiste essentiellement dans la mesure des effets thermiques associés aux changements d'état que peut subir un échantillon examiné, en fonction de la température.

En pratique, elle consiste à comparer la température de l'échantillon et celle d'un corps de référence ne présentant pas de transformation susceptible de dégager ou d'absorber de la chaleur dans l'intervalle des températures de l'expérience.

Cette méthode d'analyse, ayant d'abord été introduite en chimie minérale où elle a rendu de grands services, commence aujourd'hui à être adoptée par les chimistes organiciens. Sa très grande sensibilité, sa simplicité et ses possibilités de discernement dans des phénomènes complexes, lui confèrent un avenir prometteur dans l'immense domaine de la chimie organique.

Nous avons pensé que cette méthode, très améliorée par rapport à celle de PICHARD pourrait permettre d'analyser plus finement les phénomènes précédemment décrits et donner des possibilités nouvelles d'investigation dans l'établissement des tests de pureté et la recherche des adultérations.

Les essais que nous avons effectués nous ont montré que l'analyse thermique différentielle permet en premier lieu de mettre en évidence chez tous les beurres de cacao obtenus à partir de fèves de différentes origines ou à l'aide de procédés différents, une cristallisation principale dont la température d'équilibre liquide-solide est pratiquement constante, indiquant une composition glycéridique principale également constante. En second lieu, la mesure des aires du petit pic secondaire semble offrir le moyen de faire la distinction entre des beurres de pression et des beurres d'extraction par solvants faiblement ou non polaires. Les beurres extraits par des alcools présentent par ailleurs certaines caractéristiques qui pourraient permettre de déceler ce mode d'extraction. En effet, dans les thermogrammes des beurres extraits par des solvants polaires, le petit pic est inclus dans le pic principal, tout en y étant décelable.

Comme l'analyse selon PICHARD, l'analyse thermique différentielle fait ressortir des différences sensibles entre les beurres de cacao en fonction de leur mode d'extraction. Ces différences deviennent chiffrables grâce à l'évaluation du petit pic. De plus, la distinction qualitative devient plus précise puisqu'il est possible, par cette méthode, de distinguer le beurre de pression du beurre d'extraction par solvant non polaire, alors que la méthode PICHARD donnait dans les deux cas des courbes absolument comparables.

Examen des matières grasses de coques et de germes.

Si la courbe de solidification selon PICHARD ne permet pas d'analyser les matières grasses de coques et de germes, l'analyse thermique différentielle elle, plus générale et travaillant dans une gamme de température allant de — 10 à + 40° C, permet de mettre en évidence, pour ces matières grasses, des accidents thermiques.

DEUXIEME PARTIE

CONSTITUTION CHIMIQUE

A. - COMPOSITION GLYCERIDIQUE

I. - COMPOSITION EN ACIDES GRAS.

Composition qualitative.

Pendant longtemps les seuls acides gras signalés dans le beurre de cacao sont restés les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique, c'est-à-dire quantitativement les quatre principaux acides gras de cacao.

La chromatographie en phase gazeuse a permis, grâce à sa grande sensibilité, la mise en évidence de quelques acides gras présents à l'état de traces dans le beurre de cacao. C'est ainsi que les acides laurique [5], myristique [5], arachidique [6, 7, 8 et 9], palmitoléique [9 et 10], heptadécanoïque [10 et 11] et linolénique [11 et 12] ont été identifiés.

Composition quantitative.

Dans tous les cas les déterminations quantitatives ont été effectuées parallèlement aux déterminations qualitatives. Les résultats obtenus par les différents auteurs cités en référence dans le chapitre précédent et par deux autres non cités [13 et 14] montrent que dans le beurre de cacao les acides stéarique et oléique se trouvent sensiblement

---

Dans ce texte, les acides gras sont représentés par la première lettre de leur nom écrite en majuscules soit P. S, O, L et A pour les acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et arachidique. Plus généralement les acides saturés sont représentés par Sa et les insaturés par I.

Les glycérides sont schématisés à l'aide des lettres correspondant aux acides gras qui les composent. L'ordre des lettres traduit la position des acides gras dans la molécule de glycéride. Les lettres externes représentent les positions 1 et 3, la lettre médiane la position 2 ou β.

Pour la chromatographie en phase gazeuse, les glycérides sont définis par le nombre d'atomes de carbone contenus dans leurs molécules non compris ceux provenant du glycérol par exemple : SSS (18 × 3) = 54.

dans le rapport 1 et représentent environ 2/3 des acides gras totaux. L'acide palmitique représente lui, plus du quart de ces derniers. Le pourcentage des acides saturés du beurre de cacao oscille autour de 60.

L'étude des variations des teneurs en acides gras en fonction des origines des fèves de cacao a été entreprise pour la première fois par CHACKO et PERKINS [15], puis d'une façon systématique par WOIDICH et coll. [11].

Nous avons analysé statistiquement les résultats obtenus par ces derniers auteurs et avons montré que les teneurs en acides gras d'un beurre de cacao d'origine quelconque avaient 95 % de chances de se trouver respectivement dans les limites suivantes :

Acide palmitique	24,0 à 30,2 %	
Acide stéarique	36,2 à 37,2 %	
Acide oléique	31,3 à 36,5 %	
Acide linoléique	2,0 à 3,8 %	en poids

II. - COMPOSITION GLYCERIDIQUE.

Les résultats obtenus par plusieurs auteurs entre 1902 et 1952 à l'aide de différentes techniques : cristallisation [13, 16, 17, 18, 19 et 20], oxydation [21 et 22], distribution à contre-courant [23 et 24], fractionnement par gradient thermique [25], montrent en particulier que la fraction la plus importante, qui représente plus des trois quarts des glycérides du beurre de cacao, est la fraction monoinsaturée. Le constituant majeur de cette fraction est le 2-oléopalmitostéaride [26 et 27] qui est également le principal glycéride de cette matière grasse.

Les méthodes énoncées ci-dessus ont permis, entre les mains de leurs auteurs d'obtenir des résultats intéressants mais elles sont toutes compliquées, longues et délicates d'application. Elles nécessitent quelquefois, comme la distribution à contre-courant, un appareillage compliqué et exigent, en général, des quantités importantes de produit. De plus elles ne peuvent permettre le fractionnement des glycérides qu'en quatre types principaux Sa_3, $Sa_2 I$, $Sa I_2$ et I_3, les formes isomères ne pouvant généralement pas être mises en évidence par ces procédés. Enfin, les glycérides insaturés contenant dans leur molécule de l'acide oléique ne sont pas distingués de ceux contenant de l'acide linoléique.

Des progrès considérables ont pu être faits dans l'analyse des glycérides grâce, d'une part, à l'application d'une méthode biochimique, l'hydrolyse enzymatique et, d'autre part, à l'utilisation des techniques chromatographiques. Il est possible maintenant de résoudre un mélange complexe de glycérides plus rapidement et plus précisément qu'avant.

Hydrolyse enzymatique.

A partir du jour où il a été montré que la lipase pancréatique provoque préférentiellement l'hydrolyse des groupements esters 1 et 3 des glycérides [26, 29, 30, 31, 32 et 33], l'hydrolyse enzymatique est devenue un moyen d'investigation extrêmement fécond pour l'étude de la structure glycéridique des matières grasses. Plusieurs auteurs [34, 35, 36 et 37], par cette méthode, ont démontré que dans les glycérides du beurre de cacao la quasi-totalité des acides oléique et linoléique se trouve en position 2 (ou β).

Techniques chromatographiques.

Dans le domaine des glycérides comme dans de nombreux autres, les techniques chromatographiques ont permis d'apporter des solutions élégantes au problème de la structure glycéridique du beurre de cacao.

Les principales techniques chromatographiques utilisées pour l'étude de cette matière grasse, sont les chromatographies sur papier [38], sur colonne [39 et 40], sur couche mince et en phase gazeuse. Mais seules les deux dernières techniques ont permis d'obtenir des résultats spectaculaires.

Sur couche mince, ce sont BARRET et coll. [41] qui obtiennent les résultats les plus intéressants. En effet, ces auteurs, en se basant sur les travaux de de VRIES [42], séparent sur silicagel imprégné de nitrate d'argent les glycérides du beurre de cacao en fonction de leur degré d'insaturation et même suivant leurs formes isomères.

FRYER et coll. [43], HUEBNER [44], MARTIN et coll. [45] et PELICK et coll. [46] ont été les premiers à montrer que les glycérides peuvent être séparés par chromatographie en phase gazeuse suivant leur poids moléculaire. Mais l'application aux graisses contenant des triglycérides à haut poids moléculaire comme ceux du beurre de cacao a été lente parce que les conditions de la chromatographie ont été difficiles à établir pour obtenir un bon rendement. Elles l'ont été pour la première fois par LITCHFIELD et coll. [47] qui ont obtenu pour le beurre de cacao quatre pics correspondant aux glycérides 50 (16 %), 52 (45,6 %), 54 (37,4 %) et 56 (1,0 %).

Mais la chromatographie en phase gazeuse effectuée directement sur le beurre de cacao, bien qu'intéressante, ne permet pas d'obtenir une résolution complète du mélange de glycérides de cette graisse. Couplée avec d'autres méthodes (hydrolyse enzymatique, chromatographie sur couche mince), elle accroît considérablement ses possibilités et peut devenir une bonne méthode rapide [12, 48, 49, 50 et 51]. En particulier, AVANCINI, PEDRONI et DE FRANCESCO [52] ont mis au point, sensiblement en même temps que nous, une méthode d'analyse des glycérides du beurre de cacao basée sur les techniques chromatographiques mais ces auteurs n'ont pas obtenu par chromatographie en phase gazeuse des résultats intéressants.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. - Composition en acides gras.

Nous avons déterminé les compositions qualitative et quantitative par chromatographie en phase gazeuse de 7 beurres de cacao extraits de fèves d'origines diverses. Les esters méthyliques ont été préparés par catalyse acide (acide p-toluène sulfonique). Les conditions de la chromatographie étaient les suivantes :

- Appareil : Aerograph, modèle A 600-B. Détecteur à ionisation de flamme.
- Enregistreur : Honeywell.
- Colonne : Acier inox 3 m × 3,2 mm.
- Phase stationnaire DEGS 10 %.
- Support inerte chromosorb 80/100 lavé aux acides.
- Température de la colonne : 190° C.
- Température de l'injecteur : 230° C.
- Pression à l'entrée de la colonne : 1,260 kg/cm².
- Débit de l'azote : 26 ml/mn.
- Débit de l'hydrogène : 30 ml/mn.
- Volume injecté : environ 0,5 microlitre.
- Vitesse de déroulement du papier : 25,4 cm/heure.
- Sensibilité : $10^9 \times 1$ x.
- Atténuation : 16-8.

Dans ces conditions, nous avons obtenu pour les quatre principaux acides gras de beurre de cacao et pour l'acide arachidique les résultats qui figurent dans le tableau I.

TABLEAU I

Pourcentage en acides gras des beurres de cacao de différentes origines

	C_{16}	C_{18}	$C_{18}^{=}$	$C_{18}^{2=}$	C_{20}
Nouvelle-Guinée	25,9	34,8	35,3	2,6	1,4
Madagascar	26,8	35,1	34,9	2,7	1,5
Venezuela	27,7	31,3	36,2	3,2	1,6
Arriba	25,8	35,5	34,6	2,6	1,5
Cameroun	26,1	34,8	35,4	2,4	1,3
Iles Salomé	25,8	34,1	35,7	3,3	1,1
Trinité	28,4	33,0	34,6	2,7	1,3
$\bar{x}$	26,6	34,1	35,2	2,8	1,4
s	1,04	1,47	0,59	0,33	0,17
$\bar{x} \pm st$	24,1 à 29,1	30,5 à 37,7	33,8 à 36,6	2,0 à 3,8	1,0 à 1,8
s %	3,9	4,3	1,7	11,8	12,0

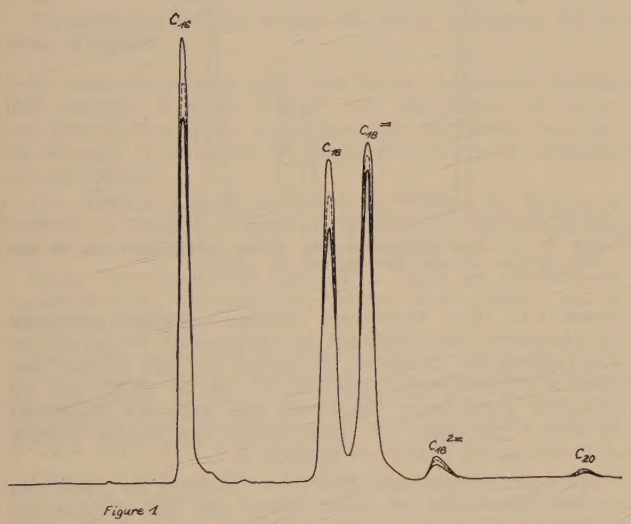

Figure 1

Figure 1. — Limites statistiques à l'intérieur desquelles un chromatogramme d'un beurre de cacao d'origine quelconque a 95 % de chances de se trouver.

Ces résultats montrent que les teneurs en acides gras des beurres de cacao varient très peu suivant leur origine. Les limites statistiques figurant dans le tableau I et illustrées par la figure 1 sont très semblables à celles que nous avons calculées à partir des chiffres obtenus par WOIDICH et coll. [11]. Dans tous les échantillons, l'acide arachidique a été retrouvé en quantité appréciable et supérieure à 1 % des acides gras totaux.

La recherche des traces peut être envisagée sous deux aspects, d'une part l'examen des acides gras mineurs apparaissant sur un chromatogramme normal permettant une estimation précise des quatre principaux acides gras et, d'autre part, l'observation des acides gras apparaissant lorsque le chromatogramme est tracé à très faible atténuation.

Les pics correspondant aux acides myristique, palmitoléique et heptadécanoïque apparaissent nettement sur les chromatogrammes des 7 beurres analysés. Avec les pics des acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et arachidique, ils donnent une image caractéristique que l'on retrouve lorque l'on trace le chromatogramme des acides gras d'un beurre de cacao d'origine quelconque.

Le chromatogramme des esters méthyliques des matières grasses d'amandes de cacao (Côte d'Ivoire) tracé à grande sensibilité (fig. 2) met en évidence avec netteté les acides mineurs du beurre de cacao, d'une part les trois principaux : les acides myristique, palmitoléique et heptadécanoïque et, d'autre part, les acides laurique, pentadécanoïque et linolénique, acides dont les pics ne sont généralement pas visibles sur les chromatogrammes tracés à sensibilité normale.

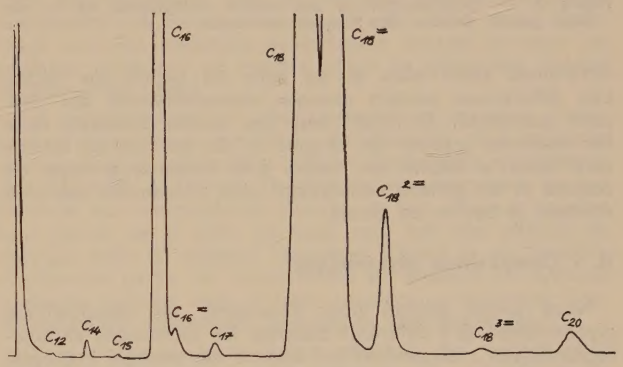

Figure 2. — Chromatogramme des esters méthyliques d'un beurre de cacao Côte d'Ivoire tracé en grande sensibilité pour mettre en évidence les traces.

Matières grasses de coques et de germes.

Si les publications concernant les pourcentages en acides gras du beurre de cacao sont nombreuses, elles sont par contre très rares pour les matières grasses de coques et de germes [53, 54 et 55].

Nous avons analysé dans les mêmes conditions que celles du beurre de cacao, la partie glycéridique des matières grasses de coques et de germes de fèves d'origine Côte d'Ivoire (fig. 3 et 4).

Les résultats que nous avons obtenus (tableau II) sont très proches de ceux publiés par KLEINERT [53]. Mais cet auteur ne signale pas, dans la matière grasse de germes, la présence de l'acide linolénique que nous avons trouvé en quantité plus importante que l'acide arachidique.

Ces chiffres montrent que les matières grasses de coques et de germes ont des compositions en acides gras assez

TABLEAU II

Pourcentages en acides gras des matières grasses de germes et de coques de cacao

	C_{14}	C_{16}	$C_{16}=$	C_{17}	C_{18}	$C_{18}=$	$C_{18}^{2}=$	$C_{18}^{3}=$	C_{20}
Beurre de germes .	0,7	31,7	0,8	0,7	13,4	17,2	32,4	2,0	1,1
Beurre de coques .	1,0	26,7	1,1	0,3	26,6	34,8	8,3	0,3	0,9

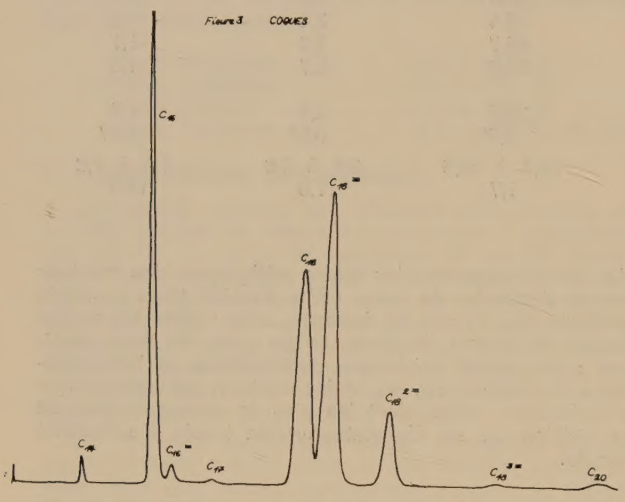

Figure 3. — Chromatogramme des esters méthyliques de la matière grasse extraite des coques de cacao.

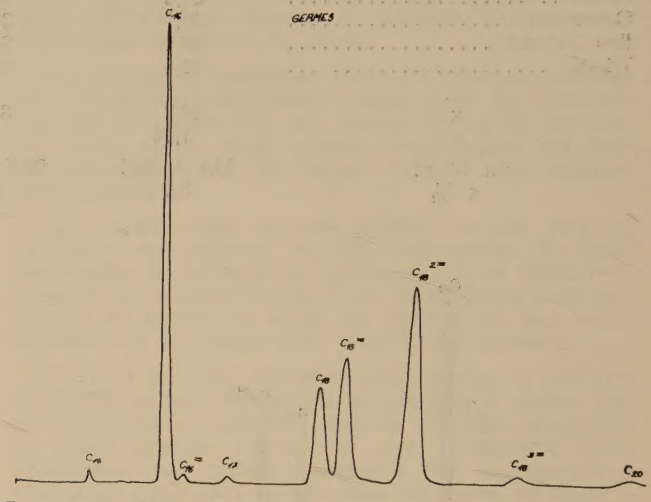

Figure 4. — Chromatogramme des esters méthyliques de la matière grasse extraite des germes de cacao.

différentes entre elles et de celle du beurre de cacao. Les différences portent presque essentiellement sur l'aspect quantitatif. En effet, tous les acides présents dans les matières grasses de coques et de germes se retrouvent dans le beurre de cacao. Les matières grasses de coques et de germes contiennent plus d'insaturés que n'en contient le beurre de cacao.

II. - Composition glycéridique.

Nous avons adopté pour déterminer les compositions glycéridiques des différents beurres, les techniques chromatographiques : séparation sur couche de silicagel imprégné de nitrate d'argent des glycérides en fonction de leur degré d'insaturation suivant une technique inspirée des travaux de BARRET et coll. [41] et détermination de la composition des différents groupes par chromatographie en phase gazeuse. Ces deux techniques couplées peuvent permettre de déterminer complètement la composition en glycérides des beurres de cacao en se basant sur les travaux des auteurs précédemment cités [26, 27, 34, 36 et 37] qui ont démontré d'une façon rigoureuse que dans les glycérides du beurre de cacao, la quasi-totalité des acides oléique et linoléique se trouve en position 2.

Les pourcentages des différentes fractions de glycérides ont été déterminés en même temps que leur composition en acides gras en ajoutant à chacune d'entre elles une quantité donnée d'un acide ne se trouvant pas normalement dans le beurre de cacao.

Tenant compte des résultats que nous avons obtenus lors de la détermination de la composition en acides gras des beurres provenant de fèves de différentes origines de cacao, on peut prévoir le nombre de glycérides correspondant à chaque bande et à chaque pic.

TABLEAU III

Glycérides devant se trouver théoriquement dans le beurre de cacao

Fractions glycéridiques → / Nombre d'atomes de carbone	48	50	52	54	56
Saturés	PPP	PSP	PPA PSS	SSS SPA	ASS
1=		POP	POS	SOS AOP	AOS
2=		PLP	PLS POO	SLS SOO ALP	ALS AOO
3=			POL	OOO SOL	AOL

Dans le tableau III donnant les glycérides possibles, nous avons fait intervenir non seulement les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique, mais aussi l'acide arachidique A. Par contre, les acides myristique, palmitoléique, heptadécanoïque et linolénique également présents dans le beurre de cacao mais à des doses très faibles, n'ont pas été retenus.

Les formes isomères des mono- et di-insaturés sont bien déterminées puisque dans le beurre de cacao les acides oléique et linoléique sont pratiquement toujours en position 2. Par contre, pour les saturés, les formes isomères écrites dans le tableau III ne laissent en rien préjuger l'existence réelle de ces formes ou l'absence de toutes autres.

Le tableau III montre que la quasi-totalité des glycérides du cacao est composée de glycérides dont le nombre d'atomes de carbone est compris entre 50 et 54. Le glycéride en 48 ne devant théoriquement se retrouver que dans la fraction saturée. Les glycérides en 56 peuvent être présents dans toutes les fractions mais évidemment en petites quantités, étant donnée la faible teneur en acide arachidique.

Chromatographie sur couche de silice imprégnée de nitrate d'argent.

La méthode utilisée que nous avons récemment publiée [56] consiste à étaler d'abord sur une plaque de verre, une couche homogène, d'une épaisseur de l'ordre de 1 mm de silicagel G imprégné de nitrate d'argent, sans employer un applicateur.

On procède ensuite au dépôt en bande du produit à analyser, à l'aide d'un capillaire à réservoir, permettant une distribution régulière de la substance.

Après développement pratiqué à l'aide de chloroforme contenant 1 % d'éthanol, les bandes sont révélées par la dichloro-2,7-fluorescéine.

Dans ces conditions, on obtient pour le beurre de cacao quatre bandes bien individualisées : deux importantes celles des glycérides mono- et di-insaturés et deux faibles correspondant, pour la supérieure aux glycérides saturés et pour l'inférieure aux glycérides tri-insaturés.

Chaque bande a été détachée de la plaque et extraite par l'oxyde d'éthyle à l'aide d'un extracteur analogue à celui utilisé pour l'extraction des fractions de l'insaponifiable.

Après évaporation du solvant sous azote, les glycérides sont repris par le sulfure de carbone et prêts pour la chromatographie en phase gazeuse.

Chromatographie en phase gazeuse.

D'après les conclusions de LICHTFIELD et coll. [47] formulées au cours d'une étude exhaustive des différents facteurs influençant la chromatographie en phase gazeuse des glycérides, les conditions optimales de cette chromatographie seraient sensiblement les mêmes que celles généralement adoptées pour l'étude des stéroïdes. Ayant étudié d'une façon approfondie les stérols [57] avant les glycérides et ayant défini à cette occasion les conditions de la chromatographie de cette fraction de l'insaponifiable, nous avons appliqué la plupart des résultats que nous avons obtenus alors à l'étude des glycérides. Seuls les points particuliers à la chromatographie en phase gazeuse de ces derniers composés sont rappelés ici.

Colonne.

Nous avons utilisé une colonne en inox de 60 cm de longueur et 3,2 mm de diamètre. Il est en effet absolument nécessaire de travailler avec des colonnes courtes. Au cours d'essais préliminaires, nous avons utilisé des colonnes de 1,2 m avec lesquelles il n'a pas été possible de récupérer les glycérides à haut poids moléculaire que sont les glycérides du beurre de cacao. Par contre des colonnes trop courtes présentent des résolutions trop faibles et ne permettent pas, de ce fait, d'analyser un mélange de glycérides de ce type. La longueur que nous avons adoptée nous a donné d'excellents résultats en séparant bien les glycérides à nombre d'atomes de carbone pairs de 48 à 56.

Phase stationnaire - support inerte.

Le choix des phases stationnaires est extrêmement limité étant donné la température élevée à laquelle il faut porter la colonne pour obtenir des séparations correctes. Pratiquement, seuls les silicones peuvent être employés. Les premiers auteurs qui ont travaillé cette question ont utilisé du SE 30 à un taux d'imprégnation allant de 30 % [43] à 0,75 % [46]. PERRON, LEFORT et coll. [58] ont obtenu d'excellentes séparations à partir de mélanges synthétiques en utilisant du SE 52 à 4 % sur chromosorb 60/80 traité DMDS.

Nous avons utilisé également SE 52 à 5 % sur Aéropack 30 exactement comme pour l'analyse des stérols. L'Aéropack 30 (100/120 mesh) est un chromosorb W lavé aux acides et traité au diméthyldichlorosilane. Comme pour les stérols ce support nous a donné des résultats très satisfaisants.

Conditions de travail.

Tous les auteurs ayant travaillé sur les glycérides ont souligné la nécessité d'adopter une température programmée non seulement dans le cas des graisses naturelles renfermant une gamme étendue de glycérides mais également pour les mélanges synthétiques simples et pour les graisses contenant un nombre limité de glycérides comme le beurre de cacao.

La programmation, si elle permet dans ce genre d'analyse d'obtenir une résolution satisfaisante d'un mélange complexe rend quelquefois difficile l'estimation quantitative des différents glycérides. De plus, la programmation devient délicate aux températures élevées et l'on observe souvent une dérive de la ligne de base qu'il est très difficile de corriger avec un appareil classique. Certes, il est possible d'éviter en partie cet inconvénient en utilisant un système à double colonne mais il reste toujours, évidemment, l'imprécision sur l'évaluation quantitative des glycérides.

C'est pourquoi nous avons effectué des essais pour réaliser une chromatographie isotherme des glycérides du beurre de cacao. Toutes choses égales par ailleurs, les conditions de température adoptées ont été les suivantes :

345° C pour la colonne,
380° C pour l'injecteur.

La température du détecteur dans le type d'appareil que nous avons utilisé est sensiblement égale à la température de la colonne. La pression d'entrée du gaz vecteur utilisé (azote) était de 1,050 kg/cm² et son débit mesuré à froid, de 67 ml/mn. Les solutions de glycérides utilisées pour l'injection étaient très concentrées, presque saturées, comme pour les stérols.

Les volumes injectés ont varié entre 0,2 et 0,3 microlitres. Dans ces conditions, le nombre de plateaux théoriques de la colonne pour les glycérides 50, 52 et 54 a été trouvé sensiblement égal à 600.

Les pics correspondant à ces glycérides étaient parfaitement séparés les uns des autres et bien symétriques (fig. 5). L'évaluation quantitative des différents glycérides a pu se faire dans les meilleures conditions.

Au cours des essais, nous avons vérifié à l'aide de glycérides étalon qu'il n'y avait pas de pertes sensibles en certains glycérides au cours de la chromatographie.

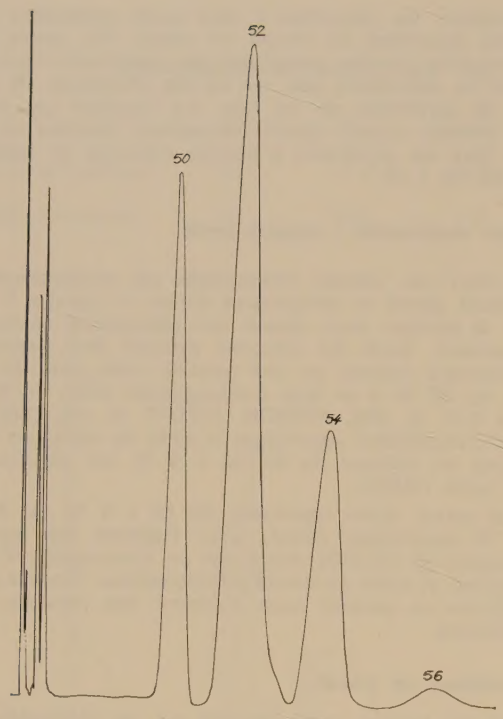

Figure 5. — Chromatogramme des glycérides du beurre de cacao.

Les témoins employés ont été le monopalmitodistéaride, le monostéarodipalmitide et le tristéaride. Dans les conditions adoptées, nous n'avons pas observé de pertes significatives pour ces trois glycérides.

Evaluation quantitative des différentes fractions glycéridiques et détermination de leur composition en acides gras.

JURRIENS [48] estime quantitativement les principales fractions glycéridiques par dosage du glycérol à l'aide de l'acide périodique. Cette estimation est relativement longue et délicate et nécessite une chromatographie spéciale sur couche de silice imprégnée de nitrate d'argent, les différents constituants glycéridiques étant détruits par l'analyse.

La méthode utilisée par AVANCINI et coll. [52] est simple et rapide. Elle ne nécessite pas la préparation d'un chromatogramme spécial et permet de récupérer intégralement les glycérides. Elle consiste à peser les différentes fractions glycéridiques après leur séparation. D'après ces auteurs cette façon de faire ne pose aucun problème particulier. Nous pensons quant à nous que ce procédé ne peut être applicable qu'aux fractions glycéridiques mono- et di-insaturées, quantitativement les plus importantes. Pour les fractions tri-saturée et tri-insaturée pondéralement très faibles l'estimation par pesée devient illusoire.

Trouvant les méthodes des auteurs précédemment cités peu satifaisantes pour les raisons ci-dessus exposées, nous avons choisi pour estimer les différentes fractions glycéridiques, le procédé de l'étalon interne. Ce procédé permet d'effectuer parallèlement à la détermination de la composition en acide gras des différentes fractions glycéridiques l'estimation quantitative de celle-ci.

Dans son principe cette méthode consiste à ajouter aux différentes fractions glycéridiques obtenues par chromatographie sur couche de silice imprégnée de nitrate d'argent, une quantité connue d'un acide gras ne se trouvant pas dans le beurre de cacao, à estérifier l'ensemble et à procéder à une analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques ainsi obtenus. Sur les chromatogrammes tracés figurent les acides gras de la fraction glycéridique analysée et l'acide gras ajouté. Il est alors possible de déterminer la composition en acide de cette fraction et de l'estimer quantitativement. Cette estimation s'effectue en évaluant l'ensemble des acides gras de la fraction par rapport à l'acide étalon.

Choix de l'étalon interne.

L'acide gras servant d'étalon interne ne doit pas se trouver dans le beurre de cacao, de plus, il est souhaitable que son temps de rétention ne soit pas, dans la mesure du possible et cela pour permettre une estimation plus précise, trop différent des acides gras rencontrés dans les différentes fractions examinées.

L'acide pentadécanoïque remplissant ces deux conditions a été adopté.

Mode opératoire.

Dans un premier temps, nous avons déterminé approximativement par pesée l'importance des différentes fractions glycéridiques :

Tri-saturées	2 %	environ des glycérides totaux
Mono-insaturées	81 %	
Di-insaturées	14 %	
Tri-insaturées	3 %	

A chaque fraction glycéridique obtenue, comme précédemment décrit, à partir de 100 mg de beurre de cacao, nous avons ajouté, en tenant compte des pourcentages relatifs des fractions tri-saturées, mono-, di- et tri-insaturées, respectivement 0,8, 16,0, 4,0 et 0,8 mg d'acide pentadécanoïque, soit : 0,5, 10, 2,5 et 0,5 ml d'une solution à 0,16 % dans le benzène. En opérant de cette façon la taille du pic correspondant est sensiblement de l'ordre de grandeur de ceux des acides palmitique, stéarique et oléique. Les erreurs d'estimation, toujours possibles, dues à une trop grande différence dans l'importance relative des pics, sont éliminées.

L'ensemble glycérides + acide pentadécanoïque est ensuite estérifié par catalyse acide suivant une méthode d'interestérification méthanolique en milieu chlorhydrique permettant d'obtenir les esters méthyliques, aussi bien à partir des acides gras qu'à partir des glycérides.

Les glycérides et l'acide étalon sont d'abord dissous dans environ 2 ml de benzène, puis on ajoute 12 ml de méthanol anhydre renfermant 5 % d'acide chlorhydrique. Après une ébullition à reflux de deux heures, à l'abri de l'humidité, la plus grande partie du méthanol est évaporée sous azote. La solution est reprise par 25 ml d'éther de pétrole et transvasée dans une ampoule à décanter.

L'extraction faite, la solution éthérée est lavée à l'eau puis séchée et filtrée sur mélange de sulfate de sodium et bicarbonate de sodium 1/1. L'éther est évaporé. Les esters sont repris par le sulfure de carbone puis chromatographiés. Les conditions de la chromatographie sont celles adoptées précédemment pour l'analyse des esters méthyliques d'acides gras.

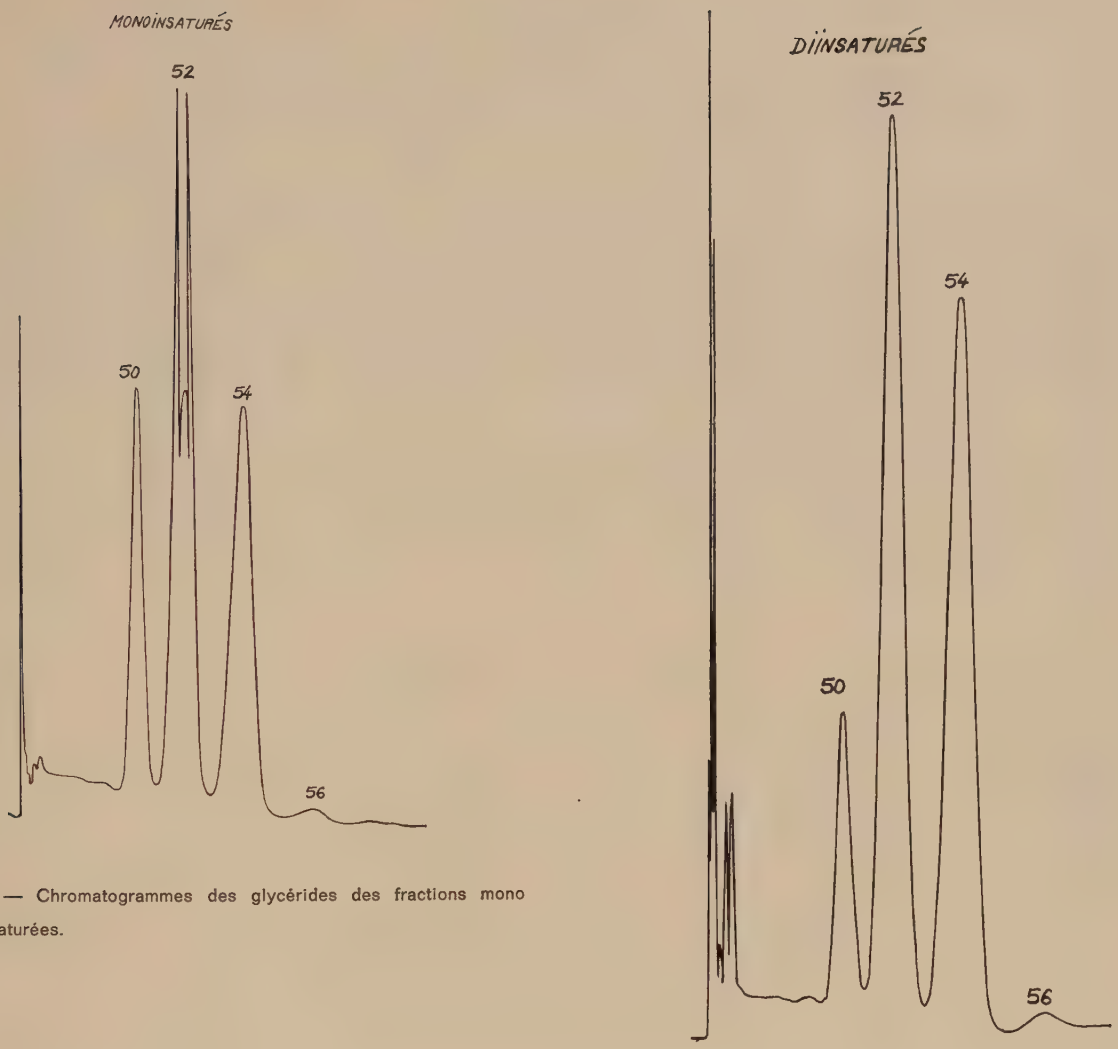

Figure 6. — Chromatogrammes des glycérides des fractions mono et diinsaturées.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de l'analyse des glycérides des beurres de cacao figurent dans le tableau IV. Les figures 6 et 7 représentent les chromatogrammes des différentes fractions glycéridiques.

L'examen de ce tableau montre que les pourcentages en glycérides des différents beurres de cacao sont très peu dispersés tout comme ceux des différents acides qui les composent (voir chapitre précédent). D'autre part, ces résultats sont très comparables à ceux publiés par LICHTFIELD [47].

En ce qui concerne les différentes fractions glycéridiques on observe des variations quelquefois importantes dans leur composition d'une origine à l'autre. Pour ces fractions il y a un certain accord entre nos résultats et ceux obtenus par JURRIENS et KROESEN [48].

Toutefois, il faut signaler quelques petites différences qualitatives et quantitatives ; par exemple dans la fraction des tri-saturés JURRIENS et KROESEN [48] ne trouvent pas de glycérides en 56, de plus la teneur dans cette même fraction de glycéride en 54 est trouvée plus forte par ces auteurs que par nous.

Dans la fraction mono-insaturée ces mêmes auteurs ne trouvent pas non plus de glycérides en 56, mais une petite quantité de glycéride en C_{54}. Le même cas se présente pour ces glycérides dans la fraction di-insaturée mais JURRIENS et KROESEN [48] trouvent une quantité relativement importante de C_{56}. Dans cette fraction les proportions des autres glycérides sont en accord avec celles que nous avons trouvées. Enfin, dans les tri-insaturées les auteurs précités ont trouvé une proportion relativement importante de C_{56}.

Dans certains cas, la fraction tri-insaturée présente une proportion de glycérides C_{50} supérieure à celle que l'on peut déduire théoriquement de la composition en acides gras. Nous n'avons pas trouvé jusqu'à présent d'explication à ce phénomène.

Les résultats concernant l'estimation des pourcentages des différentes fractions triglycéridiques des beurres de cacao figurent dans le tableau V. Ces chiffres montrent que les pourcentages des différentes fractions glycéridiques varient peu suivant l'origine des beurres de cacao.

TABLEAU IV

Composition en triglycérides des beurres de cacao de différentes origines

	Totaux				Trisaturés					1 = Liaison			
Nombre d'atomes C →	50	52	54	56	48	50	52	54	56	50	52	54	56
Trinité	20,3	46,0	31,9	1,8	8,6	32,6	40,1	16,5	2,2	20,5	50,9	26,8	1,8
Nouvelle-Guinée	20,6	46,8	30,8	1,8	8,7	34,6	41,6	15,1		20,5	51,4	27,2	0,9
Arriba	19,3	45,9	33,0	1,8	7,2	29,8	43,2	18,6	1,2	19,2	54,0	26,2	0,6
Madagascar	18,2	47,3	32,6	1,9	8,5	31,8	40,6	18,2	0,9	18,5	49,4	30,8	1,3
Venezuela	18,8	46,5	33,0	1,7	8,0	33,4	42,0	15,8	0,8	20,3	51,3	27,4	1,0
Cameroun	18,4	45,2	34,4	2,0	7,3	31,3	43,4	17,3	0,7	19,9	49,6	29,4	1,1
Salomé	19,9	46,2	31,9	2,0	9,0	33,7	41,3	15,3	0,7	21,0	49,4	28,2	1,4
$\bar{x}$	19,3	46,3	32,6	1,8	8,1	32,1	41,8	16,9	1,1	19,9	50,7	28,0	1,1
s	0,95	0,70	1,1	0,1	0,74	1,43	1,36	1,38	0,59	0,87	2,50	1,63	0,33
$\bar{x} \pm st$	17,0 à 21,6	44,6 à 48,0	30,1 à 35,3	1,6 à 2,0	6,2 à 10,0	37,9 à 46,3	38,3 à 45,3	13,3 à 20,5	0 à 2,6	17,8 à 22,0	44,6 à 56,8	24,0 à 32,0	0,3 à 1,9
s %	4,9	1,5	3,4	5,5	9,1	4,5	3,3	8,2	53,6	4,4	4,9	5,8	30,0

	2 = Liaisons				3 = Liaisons			
Nombre d'atomes C →	50	52	54	56	50	52	54	56
Trinité	12,4	47,9	37,9	1,8	8,0	34,7	55,2	2,1
Nouvelle-Guinée	12,0	48,0	38,8	1,2				
Arriba	9,5	51,0	38,0	1,5	5,9	37,7	54,1	2,3
Madagascar	16,1	47,4	34,8	1,7	12,4	46,0	40,1	1,5
Venezuela	8,7	45,4	44,2	1,7	16,7	41,9	39,6	1,8
Cameroun	10,4	45,3	43,1	1,2	12,8	43,9	41,5	1,8
Salomé	14,9	46,0	37,1	2,0	14,1	45,4	38,7	1,7
$\bar{x}$	12,5	47,0	39,0	1,5	11,7	41,6	44,9	1,8
s	3,0	1,69	4,17	0,34	4,0	4,5	7,6	0,33
$\bar{x} \pm st$	4,8 à 20,2	42,8 à 51,2	30,1 à 47,9	0,6 à 2,4	1,4 à 22,0	30,0 à 43,2	25,2 à 64,6	0,9 à 2,7
s %	24,0	3,6	10,7	22,0	34,2	10,8	16,9	18,3

TABLEAU V

Pourcentage des fractions de triglycérides des beurres de cacao de différentes origines

	Tri-saturés	1 =	2 =	3 =
Trinité	1,4	79,4	15,0	4,2
Arriba	1,5	85,4	10,6	2,5
Nouvelle-Guinée	1,6	82,9	13,3	2,2
Cameroun	0,8	76,6	18,9	3,7
Madagascar	1,6	80,7	14,2	3,5
$\bar{x}$	1,4	81,0	14,4	3,2
s	0,34	3,35	3,01	0,84
$\bar{x} \pm st$	0,5 à 2,3	71,7 à 90,3	6,0 à 22,8	1,9 à 5,5
s %	24	4,1	20,9	26,1

TABLEAU VI

Composition en acide gras des différentes fractions triglycéridiques

	Trisaturés			1 =				2 =				
	C_{16}	C_{18}	C_{20}	C_{16}	C_{18}	$C_{18}=$	C_{20}	C_{16}	C_{18}	$C_{18}=$	$C_{18}{}^{2}=$	C_{20}
Trinité	41,8	55,8	2,4	29,8	35,7	33,0	1,5	23,0	27,8	34,7	12,4	2,1
Arriba	38,1	59,7	2,1	25,2	39,4	34,2	1,2	21,4	26,5	36,1	14,6	1,4
Nouvelle-Guinée	44,8	53,1	2,1	26,7	39,0	33,0	1,3	24,2	28,7	30,2	15,2	1,7
Cameroun	43,5	54,2	2,3	29,2	36,6	32,7	1,5	19,5	25,8	40,4	12,6	1,7
Madagascar	40,9	56,5	2,6	26,9	37,9	33,7	1,5	22,1	27,2	36,1	13,1	1,5
$\bar{x}$	41,8	55,9	2,3	27,6	37,7	33,3	1,4	22,0	27,2	35,5	13,6	1,7
s	2,57	2,53	0,43	1,90	1,57	0,61	0,14	1,77	1,13	3,65	1,25	0,85
$\bar{x} \pm st$	33,7 à 49,0	48,8 à 63,9	0,5 à 4,1	22,3 à 32,8	33,3 à 42,1	31,6 à 35,0	1,0 à 1,8	14,0 à 30,0	24,1 à 30,3	25,4 à 45,6	10,1 à 17,1	0 à 3,8
s %	6,2	4,5	18,5	6,8	4,2	1,8	10,1	8,0	4,2	10,3	9,2	50,5

	3 =				
	C_{16}	C_{18}	$C_{18}=$	$C_{18}{}^{2}=$	C_{20}
Trinité	24,6	25,4	30,4	18,1	1,5
Arriba	24,9	21,1	34,8	18,0	1,2
Nouvelle-Guinée	21,4	22,6	37,9	16,1	2,0
Cameroun	19,7	19,5	39,0	20,4	1,4
Madagascar	21,8	22,2	32,0	21,9	2,1
$\bar{x}$	22,5	22,2	34,8	18,9	1,6
s	2,22	2,18	3,69	2,26	0,39
$\bar{x} \pm st$	16,3 à 28,6	16,1 à 28,2	24,6 à 44,1	11,6 à 26,2	0,6 à 2,7
s %	10,0	9,8	10,6	12,0	23,8

A partir des résultats dans les tableaux V et VI il est facile de calculer le pourcentage des différents glycérides ou groupes de glycérides par rapport à l'ensemble

Tri-saturés
- PPP 0,1 %
- PSP 0,5 %
- PSS, PPA 0,6 %
- SSS, SPA 0,2 %

Mono-insaturés
- POP 16,1 %
- POS 41,5 %
- SOS, AOP 22,9 %
- AOS 0,9 %

Di-insaturés
- PLP 1,8 %
- PLS, POO 6,8 %
- SLS, SOO, ALP 5,6 %
- ALS, AOO 0,2 %

Tri-insaturés
- POL 1,3 %
- OOO, SOL 1,4 %
- AOL 0,1 %

Pourcentage des différents glycérides et groupes de glycérides

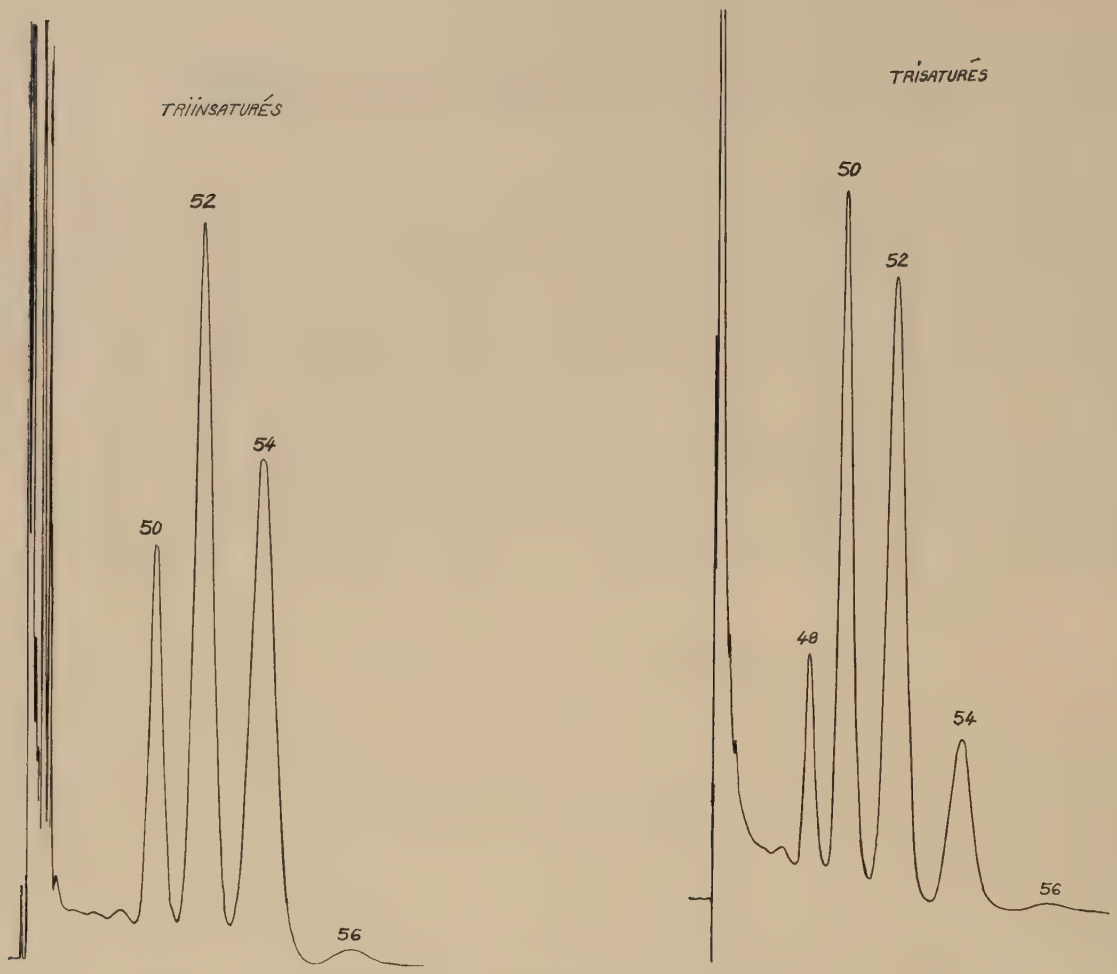

Figure 7. — Chromatogrammes des glycérides des fractions triinsaturées et trisaturées.

La fraction mono-insaturée représente les quatre cinquièmes des glycérides ; les fractions tri-saturées et tri-insaturées sont pondéralement les plus faibles ; elles représentent à elles deux sensiblement le vingtième des glycérides totaux.

Dans le tableau VI les compositions en acides gras des différentes fractions glycéridiques ont été reportées. La figure 8 représente les chromatogrammes des esters méthyliques de ces fractions. Les compositions en acides gras des quatre fractions glycéridiques varient peu suivant les origines des beurres de cacao.

Comme l'avait déjà remarqué AVANCINI et coll. [52], nous avons observé dans certaines fractions glycéridiques une concentration en divers acides gras mineurs du beurre de cacao. Par exemple, l'acide laurique pratiquement invisible sur le chromatogramme des acides gras du beurre de cacao et sur celui de la fraction mono-insaturée apparaît sur ceux des fractions saturées et di-insaturées et devient relativement important sur celui de la fraction tri-saturée.

B. - COMPOSITION DE L'INSAPONIFIABLE [1]

A l'aide des techniques chromatographiques, nous avons pu [57, 59, 60, 61 et 62] établir la composition qualitative et semi-quantitative des principales fractions de l'insaponifiable du beurre de cacao et des matières grasses de coques et de germes, à savoir :

— les stérols [57, 59 et 62],

— les terpènes [59, 61 et 62],

— les alcools aliphatiques [59, 60 et 61],

— les hydrocarbures [60],

et étudié la dispersion biologique des différents constituants de ces fractions.

Les stérols (campestérol, stigmastérol et sitostérol), les triterpènes (cycloarténol, et 24 méthylène cycloartanol), le phytol et les alcools aliphatiques (C_{20}, C_{21}, C_{22}, C_{23}, C_{24}, C_{25} et C_{26}) se retrouvent dans tous les beurres de cacao examinés au cours de ce travail.

La constance quantitative est également remarquable malgré les variations inhérentes à la dispersion biologique. Il est possible en particulier de définir, pour le beurre de cacao, un « profil stérolique » suffisamment stable pour être utilisé comme test de pureté.

1 Les travaux que nous avons effectués sur l'insaponifiable et qui ont fait l'objet de plusieurs publications seront simplement schématisés dans ce chapitre.

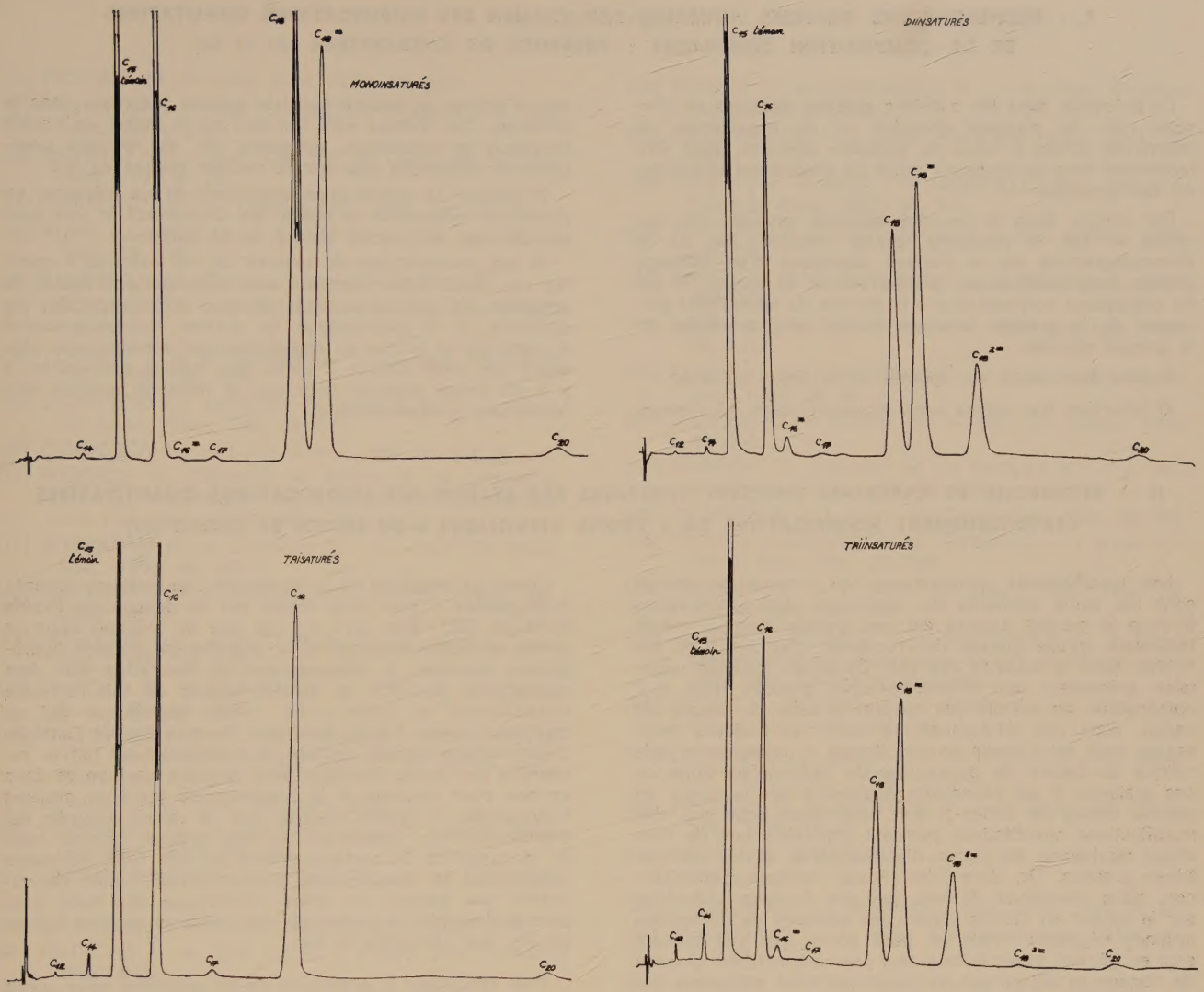

Figure 8. — Chromatogrammes des acides gras des diverses fractions glycéridiques du beurre de cacao.

De ce point de vue, la connaissance de la composition des fractions terpènes et alcools aliphatiques est plus intéressante étant donnée la complexité et l'inconstance interspécifique de cette composition.

Il en est de même de la fraction hydrocarbures malheureusement l'analyse de cette fraction peut, beaucoup moins facilement que celle des autres fractions, être effectuée d'une façon routinière

Les insaponifiables des matières grasses de coques et de germes présentent sensiblement la même composition qualitative que celle de l'insaponifiable d'amandes de cacao. Ils s'en distinguent nettement par leur composition quantitative.

TROISIEME PARTIE

APPLICATION DES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES A LA RECHERCHE DES ADULTERATIONS DU BEURRE DE CACAO

Dans cette partie la recherche des adultérations n'est pas étudiée d'une façon systématique, mais est seulement illustrée par des exemples d'applications des méthodes d'analyse exposées dans la deuxième partie de ce travail.

Les éléments fournis au cours de la détermination de la composition stérolique [57] peuvent permettre de détecter, dans un mélange, des matières grasses de déchets de cacao ou des graisses d'origine animale et cela même en présence de graisses butyriques, comme c'est le cas dans les matières grasses extraites de chocolat au lait.

I. - RECHERCHE DES GRAISSES ANIMALES PAR EXAMEN DES MODIFICATIONS QUALITATIVES DE LA COMPOSITION STEROLIQUE : PRESENCE DE CHOLESTEROL [63 et 64]

La présence dans les matières grasses extraites de chocolat noir de graisses animales ou de succédanés du beurre de cacao à base de graisses animales, peut être facilement mise en évidence grâce au cholestérol spécifique de ces graisses.

Par contre, dans le cas des graisses extraites de chocolats au lait, le problème semble insoluble car sur le chromatogramme de la fraction stérolique d'un mélange graisse butyrique/graisse animale/beurre de cacao, le pic du cholestérol correspondra à la somme du cholestérol provenant de la graisse butyrique et de celui provenant de la graisse animale.

Il peut être résolu en opérant de la façon suivante :

1° Effectuer les indices semi-microbutyriques qui permettent d'estimer le pourcentage de graisse butyrique dans le mélange. Ces indices sont fonction de la teneur en acides butyrique et caproïque, autrement dit, ils ne sont pratiquement influencés que par la matière grasse du lait.

2° Etudier la composition stérolique de ce mélange, en particulier déterminer la teneur en cholestérol et voir quel pourcentage de graisse de lait lui correspond.

Si les pourcentages de graisse de lait calculés à partir de ces deux déterminations sont sensiblement égaux, la présence de graisse animale ne peut être suspectée. Au contraire, si le pourcentage de graisse butyrique évalué à partir de la teneur en cholestérol est sensiblement plus élevé que celui obtenu à partir des indices semi-micro, il y a de fortes chances pour que le mélange analysé renferme une graisse animale.

II. - RECHERCHE DE CERTAINES GRAISSES VEGETALES PAR EXAMEN DES MODIFICATIONS QUANTITATIVES STATISTIQUEMENT SIGNIFICATIVES DU « PROFIL STEROLIQUE » DU BEURRE DE CACAO [64]

Les modifications quantitatives des teneurs en stérols sont les seuls éléments de conclusion dont on dispose lorsque la graisse ajoutée est une graisse d'origine végétale autre qu'une graisse de crucifères, c'est-à-dire en définitive dans la majorité des cas. Certaines graisses végétales présentent des différences très grandes dans leur composition en stérols par rapport à celle du beurre de cacao, mais ces différences ne sont pas toujours suffisantes pour faire sortir de ses limites la composition stérolique du beurre de cacao lors de l'adjonction d'une de ces graisses. Il est nécessaire également que la teneur en stérols totaux de celles-ci soit importante pour que des modifications quantitatives puissent apparaître lors de l'addition au beurre de cacao d'une quantité limitée de matières grasses. Or, dans l'état actuel de nos connaissances, nous disposons de très peu de données utilisables sur la teneur en stérols totaux des graisses de différentes origines végétales. Mais on peut écrire que ces teneurs sont en général assez faibles sauf pour les matières grasses de coques et de germes de cacao où elles atteignent des valeurs très importantes, si bien que dans de nombreux cas les modifications quantitatives des stérols pourront, dans la pratique, rester incluses dans les limites de variations de la composition stérolique du beurre de cacao.

Quant au problème de la recherche des matières grasses hydrogénées il peut être résolu par le dosage de l'acide élaïdique [56]. Bien qu'il n'y ait pas de relation entre la teneur en acide élaïdique et la quantité de graisses hydrogénées ajoutées, la détermination de cet acide doit être quantitative. En effet la matière grasse de lait renferme naturellement un acide trans, l'acide vaccénique qui se comporte comme l'acide élaïdique. Dans le cas de l'analyse d'une matière grasse extraite d'un chocolat au lait la recherche de l'acide élaïdique sera toujours positive et dans ce cas pour conclure à la présence de matières grasses hydrogénées il faudra montrer que la teneur trouvée est significativement supérieure à celle prévue compte tenu de la présence de matière grasse de lait. Ceci nécessite évidemment la connaissance préalable des limites de variation des teneurs en acide vaccénique des laits mais permet d'étendre la recherche des matières grasses hydrogénées aux chocolats au lait.

Pour contribuer à la solution de ce problème nous avons mis au point une méthode de détermination précise de l'acide élaïdique basée sur la séparation de cet acide sur des couches épaisses de silicagel imprégné de nitrate d'argent.

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de l'étude directe des beurres de cacao par des méthodes d'analyse thermique semblent influencés par de nombreux facteurs difficilement contrôlables.

De ce fait ces méthodes même sous leur forme la plus perfectionnée qui est l'A.T.D., ne peuvent pas être utilisées seules comme test de pureté. Les indications extrêmement rapides et souvent intéressantes qu'elles donnent doivent toujours être confirmées ou infirmées par les méthodes plus longues et délicates mais aussi plus sûres de l'analyse fine des divers constituants.

Des essais préliminaires que nous avons effectués sur des fractions glycéridiques de beurre de cacao à l'aide de l'analyse thermique différentielle ont donné des résultats intéressants. Il semble que ce soit dans cette direction que les études doivent être poursuivies.

Bien que les méthodes qui permettent d'appréhender les matières grasses dans leur ensemble soient intéressantes il semble bien que l'analyse poussée des divers constituants de celles-ci soit le moyen le plus rigoureux de les définir précisément.

L'ensemble des déterminations, basées sur les techniques chromatographiques, que nous avons mises au point, permettent d'établir relativement vite et d'une façon suffisamment précise la composition des principales fractions de l'insaponifiable du beurre de cacao.

La composition glycéridique peut être déterminée sensiblement de la même manière.

Les deux séries de déterminations peuvent permettre, dans les limites de la dispersion biologique, de définir précisément le beurre de cacao.

BIBLIOGRAPHIE

[1] PICHARD M. — Ann. fals., 1923, **16,** 197.

[2] PICHARD M. — Bull. Off. Int. du Cacao et du Chocolat, 1931, **1,** 1.

[3] PICHARD M. — Bull. Off. Int. du Cacao et du Chocolat, 1932, **2,** 29.

[4] CHAVERON H. — Choc. Conf., 1963, n° 190, 9.

[5] PURR A., LUCK H. et KOHN R. — Rev. Int. Choc., 1961, **16,** 146.

[6] KLEINERT J. — Gordian, 1962, **62**, n° 1490, 17.

[7] HOUGHTON A. et LUND N. — Rev. Int. Choc., 1959, **14,** 470.

[8] YOUNGS C. et SUBBARAM M. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1964, **41,** 218.

[9] LICHTFIELD C., HARLOW R., REISER R. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1965, **42,** 849.

[10] CHAVERON H. — Choc. Conf., 1964, n° 197, 5.

[11] WOIDICH H., GNAUER H., RIELD O. et GALINOVSKY E. — Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1964, **125,** cahier 2, 91.

[12] SUBBARAM M. et YOUNGS C. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1964, **41,** 445.

[13] HILDITCH T. et STAINSBY W. — J. Soc. Chem. Ind., 1936, **55,** 95 T.

[14] SCHOLFIELD C. et DUTTON H. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1959, **36,** 325.

[15] CHACKO G. et PERKINS E. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1964, **41**, 843.

[16] FRIZTWEILER R. — Arb. Kais. Ges. - Amt, 1902, **18,** 371 ; Chem. Zentr., 1902 (i) 1113, Z. Unters. Nahr. Genussm., 1902, **5,** 1164.

[17] KLIMONT J. — Ber., 1901, **34,** 2636.

[18] AMBERGER C. et BAUCH J. — Z. Unters. Nahr. Genussm., 1924, **48,** 371.

[19] LEWKOWITSCHE E. — J. Soc. Chem. Ind., 1933, **52,** 23, 6 T.

[20] MEARA M. — J. Chem. Soc. London, 1949, 2154.

[21] HILDICHT T. et LEA C. — J. Chem. Soc. London, 1927, 3106.

[22] LEA C. — J. Soc. Chem. Ind., 1929, **48,** 41 T.

[23] SCHOLFIELD C. et DUTTON H. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1959, **36,** 325.

[24] SCHOLFIELD C., DUTTON H. et MOUNTS T. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1961, **38,** 96.

[25] JONES G. et HAMMOND E. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1961, **38,** 69.

[26] CHAPMAN D., GROSSLEY A. et DAVIES A. — J. Chem. Soc. London, 1957, 1502.

[27] LUTTON E. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1957, **34,** 521.

[28] MATTSON F., BENEDICT J., MARTIN J. et BECK W. — J. Nutrition, 1952, **48,** 335.

[29] MATTSON F. et BECK L. — J. Biol. Chem., 1955, **214,** 115, et 1956, **219,** 735.

[30] DESNUELLE P. et CONSTANTIN M. — Int. Colloq. Biochem. Problem Lipiden, 1953, 174.

[31] SAVARY P. et DESNUELLE P. — C. R. Acad. Sci., 1955, **240,** 2571.

[32] SAVARY P. et DESNUELLE P. — Arch. Sci. Biol., 1955, **39,** 689.

[33] SAVARY P. et DESNUELLE P. — Biochim. Biophys. Acta, 1956, **21,** 349.

[34] COLEMAN M. — J. Amer Oil Chem. Soc., 1961, **38,** 685.

[35] SAVARY P., FLANZY J. et DESNUELLE P. — Biochim. Biophys. Acta, 1957, **24,** 414.

[36] MATTSON F. et LUTTON E. — J. Biol. Chem., 1958, **233,** 868.

[37] MATTSON F. et VOLPENHEIN. — J. Biol. Chem., 1961, **236,** 1891.

[38] STEINER E. et BONAR A. — J. Sci. Food Agr., 1961, **12,** 247.

[39] BLACK B. et HAMMOND E. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1961, **38,** 96.

[40] STEINER E. et BONAR A. — Rev. Int. Choc., 1965, **20,** 248.

[41] BARRETT C., DALLAS M. et PADLEY F. — J. Am. Oil Chem. Soc., 1963, **40,** 580.

[42] DE VRIES B. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1963, **40**, 184.

[43] FRYER F., ORMAND W. et CRUMP G. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1960, **37,** 589.

[44] HUEBNER V. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1959, **36,** 262, et 1961, **38,** 628.

[45] MARTIN A., BENNETT C. et MARTINEZ F. — Jr. Paper presented st 3rd. Symposium on gas chromatography, June 1960, Edinburgh, Scotland.

[46] PELICK N., SUPINA W. et ROSE A. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1961, **38,** 506.

[47] LICHTFIELD C., HARLOW R. et REISER R. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1965, **42,** 849.

[48] JURRIENS G. et KROESEN A. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1965, **42**, 9.

[49] PRIVETT O. et BLANK M. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1963, **40,** 70.

[50] YOUNGS C. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1961, **38,** 62.

[51] YOUNGS C. — J. Amer. Oil Chem. Soc., 1964, **41,** 2 T 8.

[52] AVANCINI D., PEDRONI G. et DE FRANCESCO F. — Rev. Ital. Sost. Gras., 1966, **43,** 450.

[53] KLEINERT J. — Rev. Int. Choc., 1963, **18,** 8.

[54] BAUER K. et SEBER L. — Fette u. Seifen, 1938, **45,** 293.

[55] SEBER L. — Gordian, 1939, **45,** n° 1057, 14 ; n° 1060, 12 ; n° 1059, 12.

[56] PERRON R., BLANCHARD P., CHAVERON H et AUFFRET M. — Choc. Conf., 1966, **223,** 15, et Rev. Fr. Corps Gras, 1967, **14,** 241.

[57] CHAVERON H. — Choc. Conf., 1966, n° **218,** 13.

[58] LEFORT D., PERRON R., POURCHEZ A., MADELMONT C. et PETIT J. — J. Chromatog., 1966, **22,** 266.

[59] CAPELLA P., FEDELI E., CIRIMELE M. et CHAVERON H. — Rev. Fr. Corps Gras, 1964, **11,** 583.

[60] CHAVERON H. — Choc Conf., 1965, n° **212,** 16.

[61] CHAVERON H. — Choc. Conf., 1966, n° **222,** 25.

[62] CHAVERON H. — Rev. Fr. Corps Gras, 1967, **14,** 21.

[63] CHAVERON H. — Choc. Conf., 1966, n° **224,** 16.

[64] CHAVERON H. — Choc. Conf., 1966, n° **220,** 14.

SEPAIC, 42, rue du Louvre, Paris-1er